О.В. Градов

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ УСТАНОВКИ ДЛЯ ОЗОНОМЕТРИЧЕСКОЙ МИКРОСКОПИИ

Аннотация

Предложен новый метод микроскопии, позволяющий измерять уровень свободных радикалов, активных форм кислорода и радиомиметиков, вырабатываемых в клетке при окислении или под действием излучения в корреляции с индуцирующими их выработку факторами – озоном и ультрафиолетовым облучением. Предложенный метод позволяет проводить измерения в различных спектрозональных диапазонах и сопоставлять физиологическое воздействие данных агентов морфологическим изменениям гистологических структур, в том числе в динамике – при мониторинге и длительных экспериментах.

Люминесцентная микроскопия, ультрафиолетовая микроскопия, ультрамикроскопия немыслимы без использования высокомощных источников излучения – газоразрядных ртутных ламп, в том числе ламп высокого давления, являющихся высокоэффективными «генераторами» озона (то же самое характерно и для эксимерных ламп). Между тем, озон при микроскопии биологических объектов представляет угрозу для культур тканей, имея токсико-химическое взаимодействие с последними на молекулярном уровне [1]. Работы, рассматривающие вопросы физиологической опасности озона [2]-[5], основаны на представлениях о воздействии озона, продуцируемого ультрафиолетовым облучением [6]. С другой стороны, озон может рассматриваться как низкомолекулярный фармацевтический агент [7], характеризуемый высокой эффективностью неспецифического воздействия на ткани, что не в меньшей степени, чем вышеупомянутый токсический эффект, может являться источником морфофизиологических артефактов при наблюдениях культур тканей in vitro. Достаточно отметить, что биоцидное действие ультрафиолетового излучения базируется во многих методах не на прямом облучении объектов и сред, а на воздействии озона на последние [8]-[10]. Это требует создания методов и установок для дозиметрии и озонометрии при микроскопических манипуляциях с тканями [11]. Данное требование согласуется с предписаниями международных и национальных организаций медико-экологического профиля, требующих учета проблемы озона как на глобальном, так и на локальном уровнях [12], [13], так как, помимо исследуемых тканей, озон воспринимается также и человеком – оператором микроскопии, что особо нежелательно при работе в режиме мониторинга в ходе длительных экспериментов.

Конструкция установок

Для решения этой проблемы были разработаны две установки для озонометрической ультрафиолетовой и озонометрической люминесцентной микроскопии при ультрафиолетовом возбуждении. Обе установки включали в себя анализатор озона, с помощью шлангов подсоединенный к микроскопическому блоку, на оптической части которого был зафиксирован измеритель параметров излучения, и ЭВМ, на которую подавались сигналы анализатора озона и других взаимодействующих с установкой измерительных устройств.

Результатом измерений является сопоставление динамики энергетической освещенности, концентрации озона и формы морфологической реакции клеток или тканей на внешнее воздействие ультрафиолетовым облучением и озоном с возможностью разделения результатов влияния того и другого. Ниже описываются два варианта монтажа установки, непосредственно апробированные автором.

Ультрафиолетовая озонометрическая микроскопия. В качестве микроскопического шасси использовали «Биолам-70» с кварцево-линзовым конденсором для проницаемости в ультрафиолетовой области. Микроскоп устанавливали на корпус бактерицидного облучателя, в качестве источников излучения которого использовали две лампы ДРБ-8 мощностью 8 Вт с характеристической длиной волны 253,7 нм или лампы Вуда, тип «Philips TL8W/08», мощностью в диапазоне UV-A 1,3 Вт и отношением UV-B/UV-A 1:4 при длинах волн 350...380 нм. Для измерения энергетической освещенности использовали спектрально-селективный УФ-радиометр ТКА-ПКМ 12 (ТКА-АВС) и люксметр-УФ-радиометр ТКА-ПКМ 06. Использовались полупроводниковые твердотельные детекторы излучения штатного типа, обладающие спектральной чувствительностью (*рис. 1а, б*) для первого и второго типов приборов соответственно. В качестве анализатора озона использовали измеритель массовых концентраций озона «Циклон-5», ЗАО «Оптэк» (*рис. 2*). Сигнал анализатора выводился через интерфейс RS-232 на ЭВМ, а также через выходы для подключения самопишущих приборов на мультиметры серии М-83 (М-830, DVM-830, М-832, DVM-831). Полученные данные регистрировались после замены тринокулярной насадки на оптически-модернизированный аппарат типа РА-7 камерой «CANON 590 IS» под управлением процессора «DIGIC III» с возможностью наблюдения спектрозональной RGB-гистограммы в режиме реального времени. Внешний вид этого варианта

установки в сборе приведен на *рис. 3*. Данная установка может работать как люминесцентный озонометрический анализатор при использовании вместо ДРБ-8 (UV-C) ламп TL8 (UV-A), вызывающих флуоресценцию.

Люминесцентная озонометрическая микроскопия. Были изготовлены два варианта установки на базе микроскопов «Люмам» и МЛ-2. Стандартная схема системы с опущенными системами подкачки и регистрирующей камерой представлена на *рис. 4*. Она включает в себя те же блоки, что и установка ультрафиолетовой микроскопии. Однако при этом изменяются база и тубус микроскопа, что позволяет провести измерительные коммуникации и воздушные шланги в основе аппарата. Функцию измерителя уровня аналогового сигнала выполняет не мультиметр, а самописец или осциллограф. Кроме того, можно ввести две точки измерения характеристик ультрафиолетового излучения – непосредственно в корпусе «генератора» или над его поверхностью и в точке выхода пучка на препарат, что позволит сравнить действие излучения на персонал и на препарат.

Следует отметить, что хотя люминесценция возбуждается одним диапазоном длин волн, спектр стандартной ртутной лампы, используемой в качестве излучателя в люминесцентных микроскопах, содержит большее количество линий в ультрафиолетовом диапазоне. Аналогичным образом обстоит дело с применением в качестве ультрафиолето-

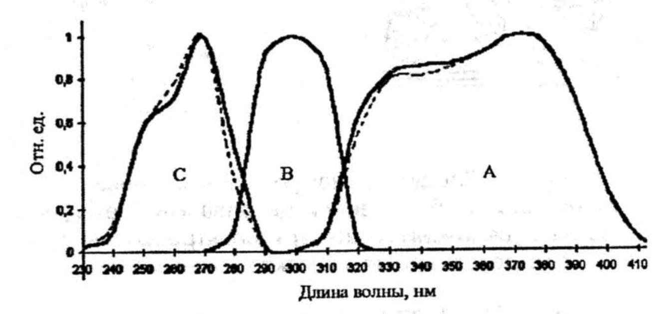


Рис. 1а. Относительная спектральная чувствительность ТКА-АВС в трех диапазонах С, В и А, отмеченных на *рисунке* соответствующими литерами



Рис. 1б. Относительная спектральная чувствительность ТКА-ПКМ 6

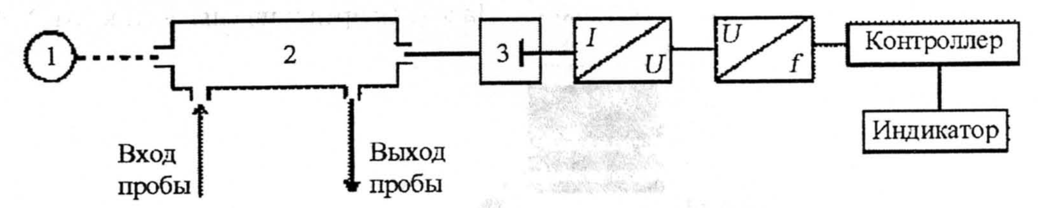


Рис. 2. Блок-схема газоанализатора: 1 – ртутная лампа; 2 – оптическая кювета; 3 – фотоприемник

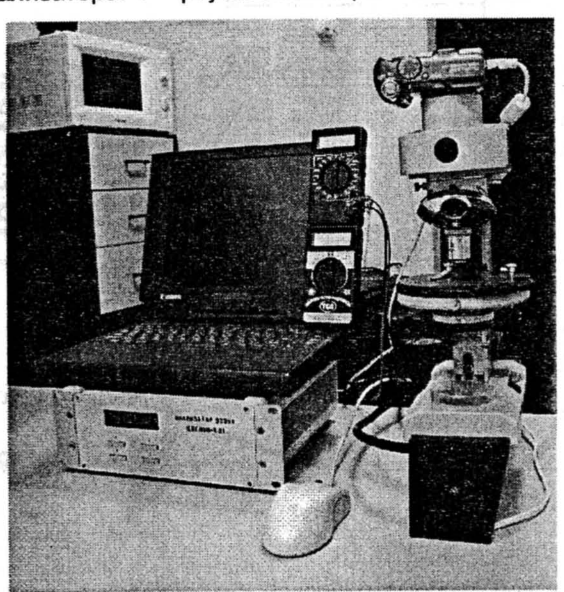


Рис. 3. Внешний вид установки озонометрической УФ-микроскопии

вых источников ксеноновых и дейтериевых ламп, а также ксенон-хлорных ламп. Поэтому целесообразно использовать детекторы для различных спектральных областей при фиксации энергетической освещенности в разных частях оптического тракта установки. Это необходимо, в частности, для того, чтобы при пересчете энергетической освещенности на площадь микропрепарата представлять удельное воздействие на него излучений, влияющих на разные области, или компартменты, клеток. В описанной выше установке для люминесцентной озонометрической микроскопии использовались датчики ТКА-АВС, обладающие чувствительностью в диапазонах UVA и UVB 10...60000 мВт/м^2 и в диапазоне UVC 1,0...20000 мВт/м^2 по стандарту ISO-DIS-21348.

Синхронное картирование и его результаты

Эксперимент по сравнительному картированию повреждений и зон биохимической чувствительности может быть организован следующим образом. Визуализируя трехмерные профили яркости по наиболее близкому к УФ коротковолновому спектрозональному каналу (В) с помощью программы «Optimas» (v. 6.1) при непосредственном контроле чистоты спектрозональной фильтрации с использованием вектороскопа, можно получить профилирование трансмиттанса (пропускания) клетки, а следовательно – области относительной резистентности к повреждениям (*рис. 5*). Области локальных минимумов соответствуют ядру и оболочке-

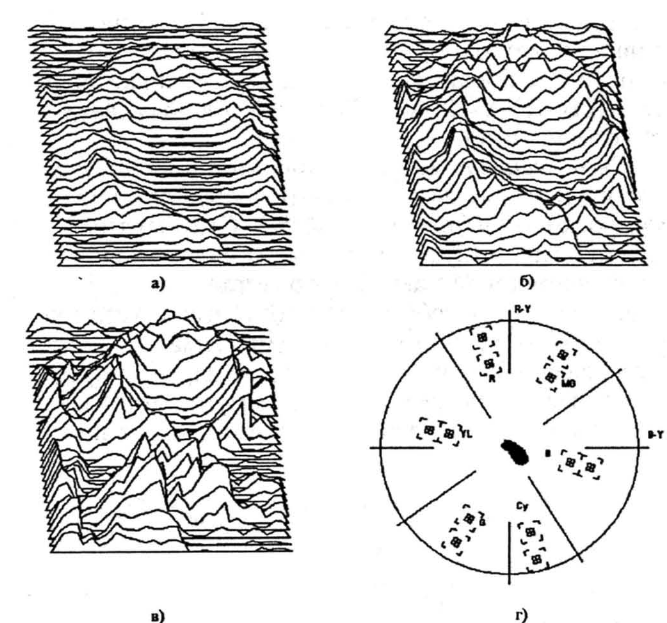


Рис. 5. Профилирование трансмиттанса (пропускания) обводненной цитоплазмы клетки на разных увеличениях (а)–(в) и спектрозонально-соответствующая им векторограмма (г)

мембране. Это позволяет предположить, что они нерезистентны к воздействию. В пользу такого предположения говорит наличие максимумов окисления (т. е. зон изменения редокс-статуса клетки), соответствующих локальным минимумам на *рис. 5*. На *рис. 6а* представлены результаты УФ-микроско-

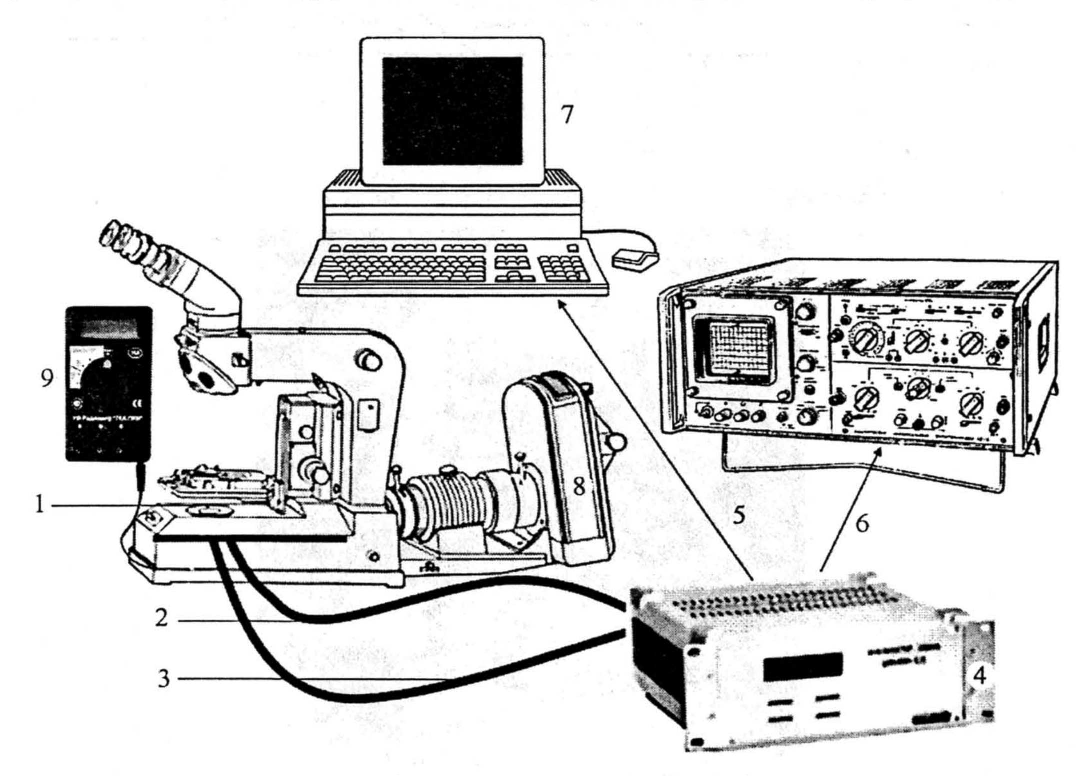


Рис. 4. Установка люминесцентной озонометрической микроскопии в процессе монтажа: 1 – апертура и кварцевое стекло; 2 и 3 – шланги; 4 – анализатор озона; 5 – шлейф RS-232; 6 – BNC-выход на осциллограф; 7 – ЭВМ, 8 – источник излучения; 9 – УФ-радиометр ТКА

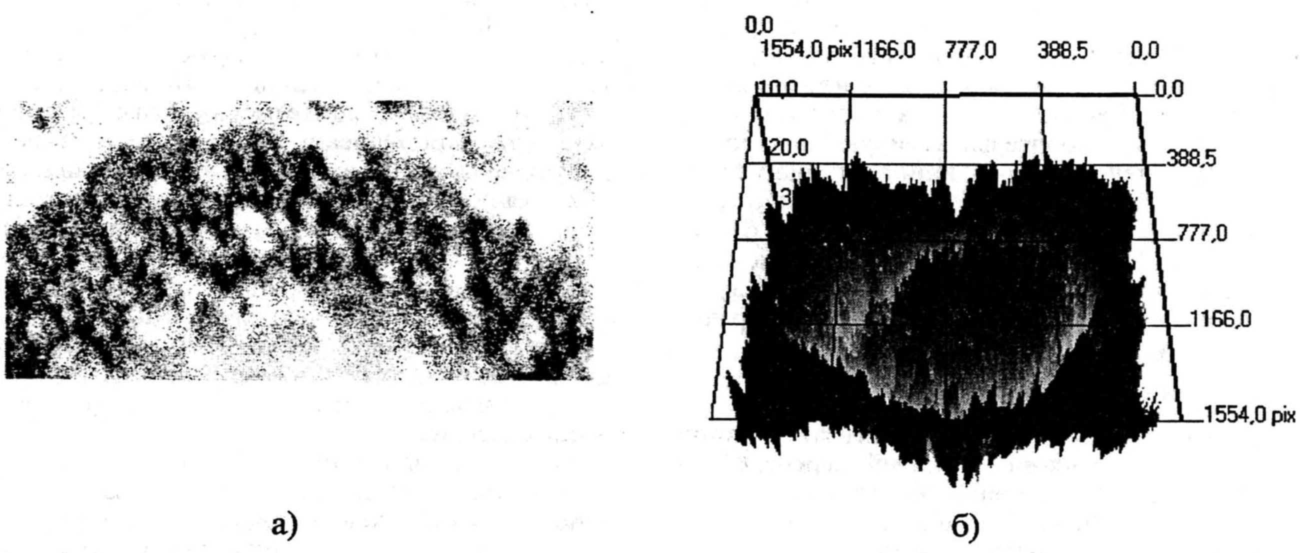


Рис. 6. Структурная и оптическая гетерогенность микроструктуры клетки как критерий редокс-картирования

Озон, ед. Добсона
290 289 288 287 286 285 284 283 282
0 10 20 30 40 50
Время, мин

а)

Озон, ед. Добсона
350 300 250 200 150 100 50
10:38:00 10:48:00 10:58:00 11:08:00
Время мониторинга, чч:мм:сс

б)

Озон, ед. Добсона
282,4 282,2 282,0 281,8 281,6 281,4 281,2 281,0
0 10 20 30 40 50
Время, мин

в)

Рис. 7. Формы изменения концентрации озона в установке для ультрафиолетовой озонометрической микроскопии в норме (а) и при дефектах эксплуатации (б, в)

пии кортикального слоя цитоплазмы, указывающие на реактивное увеличение ее гранулярности, а на *рис. 6б* представлена фотометрическая абсорбционная структура данной клетки, согласно которой ядро и мембранная оболочка с кортикальным слоем являются наиболее флуктуирующими по экстинкции, а следовательно, наиболее гранулированными и гетерогенными по редокс-компартментализации зонами, из чего следует, что тезис о коммутативности УФ-трансмиссионной и редокс-карт верен, что логично, так как действие УФ-излучения и озона как радиомиметика должны коррелировать между собой.

Регистрация кинетических режимов

Известно, что биологическое действие озона прямо связано с его концентрацией в среде. С позиций градиентных измерений важным является не только сама концентрация, но и кинетика ее изменения, т. е. характеристика скорости увеличения концентрации в пространстве–времени. По достижении определенной стандартной величины концентрации O_3 он образует стационарно-поддерживающийся слой. Индицировать его наличие можно, используя единицы Добсона при измерениях концентрации озона. Единица Добсона соответствует слою озона в 10 мкм при стандартных температуре и давлении, что соответствует $2{,}69 \cdot 10^{16}$ атомов озона на 1 см^2 поверхности (0,447 ммоль/м^2). Следует помнить, что измерения в единицах Добсона привязаны к стандартизированным условиям температуры и давления (STP), вследствие чего, при наличии прокачки в схеме озонометрической микроскопии, не следует забывать о необходимости привязки результатов измерений к скорости прокачки. От этого не будет изменяться кинетика, но может варьировать абсолютное содержание в единицах Добсона.

Рассмотрим кинетику нарастания концентрации озона в установке ультрафиолетовой ознометрической микроскопии с прокачкой, представленной на *рис. 3*. При достаточно малом объеме облучателя происходит быстрое насыщение его внутреннего пространства озоном, что позволяет проводить калибровочные кинетические измерения в экспресс-режиме. В различных режимах прокачки и при различной кондиции ультрафиолетовых источников кинетика будет меняться; на *рис. 7а* показана кривая для нормальных STP-условий. Эта кривая характеризуется на начальном этапе высокой скоростью синтеза озона – 0,6 ед. Добсона/мин, а относительно равновесное состояние синтеза–диссоциации достигается между 288 и 289 ед. Вместе с тем, если лампа работает нестабильно, мерцает, а прокачка поддерживает давление, отличное от стандартного, то при сохранении формы кинетической кривой абсолютное значение озоновой концентрации и ее стабильность при выходе на стационар существенно меняются (*рис. 7б*). При исходно заниженном содержании озона до 100 ед. Добсона в вакуумированных исходных условиях с подкачкой баллонного газа рост концентрации идет с другой кинетикой (до 27 ед./мин), но кривая имеет тот же характер. Начиная с 270 ед. Добсона, при тренде выхода на стационар регистрируются колебания концентрации озона, обусловленные интенсивной работой прокачки и попеременным отключением ламп излучателя. Описанный эксперимент демонстрирует возможные изменения кинетики при дефектах установки или же неправильно выставленных режимах обслуживающего оборудования. На *рис. 7в* представлены результаты измерений при отключении прокачки и малом диаметре отводящих озон патрубков: концентрация растет медленно (скорость нарастания концентрации снижена до 1 ед. за 40 мин) и линейно, из чего следует, что озон практически не проходит в регистрирующую часть газоанализатора.

Также на регистрацию кинетики могут существенно влиять характеристики используемого в установке стекла. Стекло следует подбирать не по отсутствию полос поглощения только в бактерицидном диапазоне UVC, а по полному спектру, включая спектральные области возбуждения люминесценции. Это зависит от модели микроскопа, на базе которого монтируется установка озонометрической микроскопии.

Обсуждение

Корреляционная озонометрическая микроскопия представляет собой метод, позволяющий сопоставлять ультрафиолетовую восприимчивость, редокс-статус сред, окисляемых с изменением экстинкции, и потенциально влияющую на биологические образцы активность озона в среде. Этот метод может найти применение в цитохимических и гистохимических методах, связанных с использованием ультрафиолетового излучения, в том числе в:

- флуоресцентной визуализации генетического материала в оптической микроскопии;
- селективном флуоресцентном маркировании клеток;
- наблюдении и измерении автофлуоресценции;
- конфокальной флуоресцентной микроскопии и фемтосекундной биофотонике на коротковолновых ультрафиолетовых лазерах;
- стандартизации и сертификации протоколов рутинной флуоресцентной микроскопии;
- флуоресцентном иммуноанализе и флуоресцентном маркировании антигенов;
- биомембранологии и многих других.

В силу конструктивной простоты описанных схем разработка, монтаж и отладка озонометрических микроаналитических установок на базе имеющихся микромеханических и окулярных компонентов микроскопов при кардинально изменяемой оптической схеме могут быть под силу неспециалисту в области оптики. Из этого следует конструктивная гибкость описанной системы, а следовательно – возможность адаптации ее под нужды пользователя в биологической лаборатории.

Автор выносит благодарность зам. зав. лабораторией фотобионики ИХФ РАН А.В. Лобанову, где была начата работа в описанном в статье направ-

лении, а также заведующей лабораторией нейронной структуры мозга ФГБУ НЦН РАМН Л.А. Бережной, позволившей длительное время заниматься представленной в статье проблематикой в отрыве от рутинных изысканий, входящих в план лаборатории. Автор благодарит также студентов, участвовавших в тестировании системы и ее целевой доработке при получении первичных кинетических кривых.

Список литературы:

1. *Goldstein B.D.* The biochemical toxicology of ozone. – American Petroleum Institute, 1977. 290 p.
2. *Reagan P.L.* Hazards of ozone to human health. – Clear Air-Clear Water Unlimited, 1981. 97 p.
3. *McKee D.* Tropospheric Ozone: Human Health and Agricultural Impacts. – CRC Press, 1993. 352 p.
4. *Miller M.* Fundamentals of Extrapolation Modeling of Inhaled Toxicants: Ozone and Nitrogen Dioxide. – CRC Press, 1984. 303 p.
5. *Adams W.C.* Ozone toxicity effects consequent to prolonged, high intensity exercise in trained endurance athletes: Final report (Submitted in fulfillment of ARB contract AO-078-32; 31.08.1982). – University of California, Davis. Human Performance Laboratory, California. Air Resources Board, 1982. 53 p.
6. *Hessen D.O.* UV Radiation and Arctic Ecosystems. – Springer, 2002. 341 p.
7. *Bocci V.* Ozone: A New Medical Drug. – Springer, 2010. 322 p.
8. Ozone in Food Processing / Ed. by C. O'Donnell, B.K. Tiwari, P.J. Cullen, R.G. Rice. – Wiley-Blackwell, 2012. 312 p.
9. Oxygen/Nitrogen Radicals: Cell Injury and Disease. Ed. by V. Vallyathan, V. Castranova, X. Shi. – Springer, 2002. 420 p.
10. Ozone in Water Treatment. Application and Engineering. Ed. by B. Langlais, D.A. Reckhow, D.R. Brank. – Lewis Publishers, 1991. 569 p.
11. *Overton J.H., Miller F.J.* Dosimetry modeling of inhaled toxic reactive gases. In: Air Pollution, the Automobile, and Public Health. – National Academic Press, 1988. PP. 367-386.
12. Estimating Mortality Risk Reduction and Economic Benefits from Controlling Ozone Air Pollution, Committee on Estimating Mortality Risk Reduction Benefits from Decreasing Tropospheric Ozone Exposure & Board on Environmental Studies and Toxicology. National Research Council (U.S.). – National Academic Press, 2008. 220 p.
13. Ultraviolet Radiation: An Authoritative Scientific Review of Environmental and Health Effects of UV, with Reference to Global Ozone Layer Depletion. United Nations Environment Programme, World Health Organization, 1994. 352 p.

Олег Валерьевич Градов,
мл. научный сотрудник,
лаборатория нейронной
структуры мозга ФГБУ НЦН РАМН,
г. Москва,
e-mail: o.v.gradov@gmail.com

СОДЕРЖАНИЕ

ТЕОРИЯ И КОНСТРУИРОВАНИЕ

CONTENTS

THEORY AND DESIGN

УЧРЕДИТЕЛЬ И ИЗДАТЕЛЬ:

Союз общественных объединений «Международное научно-техническое общество приборостроителей и метрологов»

Главный редактор
СЕЛИЩЕВ С.В., д-р физ.-мат. наук, профессор

Журнал зарегистрирован в Федеральном агентстве «Россвязьохранкультура» РФ.
Свидетельство о регистрации ПИ № ФС 77-30909

Журнал «Медицинская техника» зарегистрирован в ВАК РФ как научное издание

Журнал «Медицинская техника» переводится на английский язык в США издательством «Springer» и выходит в свет под названием «Biomedical Engineering»

Сдано в набор 20.10.2012. Подписано в печать 20.11.2012.
Формат 60×88 1/8. Бумага офсетная. Печать офсетная.
Печ. л. 7. Зак. 714
Цена журнала – договорная

Подписной индекс:
в каталоге Агентства «Роспечать» – 72940.

Адрес редакции:
119034, г. Москва, ул. Остоженка, д. 1/9, оф. 12
Телефон: (495) 695-10-70.
Тел./факс: (495) 695-10-71
E-mail: sersel@miee.ru, kavalerov@mail.ru http://www.mtjournal.ru

Отпечатано в ООО «Подольская Периодика»
142110, г. Подольск, ул. Кирова, д. 25